

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-157260
 (43)Date of publication of application : 13.06.2000

(51)Int.Cl. C12N 5/06
 //(C12N 5/06
 C12R 1:91)

(21)Application number : 10-335156 (71)Applicant : TOYOBO CO LTD
 (22)Date of filing : 26.11.1998 (72)Inventor : TAKAHASHI HIDEKAZU
 YAMAGUCHI TATSUYA
 ISHIBASHI TAKUYA
 KAWAMURA YOSHIHISA

(54) DIFFERENTIATION INDUCTION OF PRIMARY PRECURSOR ADIPOSE CELL, AND CULTURE MEDIUM FOR ITS DIFFERENTIATION

(57)Abstract:
 PROBLEM TO BE SOLVED: To evaluate therapeutic agents for obesity, diabetes and the like in no need of consideration on the influence of serum components by inducing the differentiation of the primary precursor adipose cells to adipose cells in a nutrient medium containing insulin or the like, selenious acid or its salt, indomethacin or the like.
 SOLUTION: The differentiation of a primary precursor adipose cells to the adipose cells is induced in a nutrient culture medium selected from among the Eagle basal medium (MEM), α -Eagle basal medium (α MEM), Dulbecco-modified Eagle medium (DMEM), and Ham' F-12 medium, including insulin, transferrin, dexamethasone, biotin, ascorbic acid, glucose, epidermal growth factor, or fibroblast growth factor, and selenious acid or its salts, in addition at least one selected from the group consisting of indomethacin, prostaglandin, long-chain fatty acid and thiazolidine derivative. In a preferred embodiment, ≤ 3 wt.% of serum is added to the nutrient culture.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.03.2003
 [Date of sending the examiner's decision of rejection]
 [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
 [Date of final disposal for application]
 [Patent number]
 [Date of registration]
 [Number of appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of extinction of right]

64 4 3816051

Ministry of Economic
Development
Manatū Ōhanga

Intellectual Property Office
of New Zealand

RECEIVED
06 SEP 2005

5 September 2005

HENRY HUGHES
P O Box 356
Wellington

Patent Application No: 539582
In the Name of: SUCAMPO AG
Your ref: P20239

Examination Report

Thank you for your application that became examinable under the National Phase (under section 26(G)) on 23 May 2005.

Examination has been performed on the specification as filed, your letter dated 21 April 2005, a Patents Form 43, amended pages 30-33 showing proposed amendments, formal amended pages 30-33 and Patent Form 24.

1. Section 2:

Claims 1-13, 26 and 27: These claims are refused on the basis that methods of medical treatment of humans are not patentable inventions pursuant to section 2 of the Patents Act 1953. The applicant is referred in this regard to the unanimous decision of the Court of Appeal in *Pfizer Inc v Commissioner of Patents* [2005] 1 NZLR 362.

Claims 26 and 27 are included in this objection as it is considered that they include details of a treatment regime.

2. Section 13

An ISR has been prepared for the present application and the citations raised against the novelty of the claimed subject matter are reiterated and maintained against claims 1-30.

Additionally, it would appear that JP2000157260 anticipates claims 1-30.

3. Section 10(4)

3. 1. Claim 14 is unclear in that the novelty of the claimed prostaglandin appears to reside in the purported use. If some other feature other than mere novelty of purpose is intended to be included in claim 14 then it should be recited specifically.

3. 2. Claim 31 is not acceptable as it is devoid of any specific subject matter and places the onus upon the reader to determine the subject matter and scope thereof.

受信時刻 1月31日 12時05分

64 4 3816051

2

Application No: 539582

The time for completion of all matters expires on **5 December 2006**. An extension of time of up to three months may be requested under section 19(2).

Please contact me if you have any questions.

Yours sincerely



Mark Pritchard
Intellectual Property Advisor, Patents
For Commissioner of Patents, Trade Marks and Designs
Phone: +64 4 560 1665
mail@iponz.govt.nz

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-157260

(P2000-157260A)

(43) 公開日 平成12年6月13日 (2000. 6. 13)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

キーワード (参考)

C 1 2 N 5/06

C 1 2 N 5/00

E 4 B 0 6 5

// (C 1 2 N 5/06

C 1 2 R 1:91)

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平10-335156

(22) 出願日 平成10年11月26日 (1998. 11. 26)

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号

(72) 発明者 高橋 秀和

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 山口 達哉

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 石橋 卓也

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 初代前駆脂肪細胞の分化誘導方法及びその分化用培地

(57) 【要約】

【課題】 無血清あるいは低血清の条件下で、効率良く初代前駆脂肪細胞を脂肪細胞に分化誘導させる方法及びその分化用培地を提供する。

【解決手段】 インスリン、トランスフェリン、デキサメタゾン、ヒオチン、アスコルビン酸、グルコース、上皮成長因子若しくは繊維芽細胞成長因子、ならびに亜セレン酸若しくはその塩を含有し、かつインドメタシン、プロスタグランジン、長鎖脂肪酸およびチアゾリジン誘導体よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物を含む栄養培地中において初代前駆脂肪細胞を脂肪細胞へ分化誘導する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インスリン、トランスフェリン、デキサメタゾン、ヒオチン、アスコルビン酸、グルコース、上皮成長因子若しくは繊維芽細胞成長因子、ならびに亜セレン酸若しくはその塩を含有し、かつインドメタシン、プロスタグランジン、長鎖脂肪酸およびチアゾリジン誘導体よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物を含む栄養培地中において初代前駆脂肪細胞を脂肪細胞へ分化誘導する方法。

【請求項2】 3%以下の血清を含む請求項1記載の栄養培地を用いた初代前駆脂肪細胞を脂肪細胞へ分化誘導する方法。

【請求項3】 請求項1または2に記載の栄養培地がイーグル基本培地(MEM)、アルファイーグル基本培地(α MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、ハムのF-12培地から選ばれる少なくとも1種である初代前駆脂肪細胞を脂肪細胞へ分化誘導する方法。

【請求項4】 栄養培地がインスリン、トランスフェリン、デキサメタゾン、ヒオチン、アスコルビン酸、グルコース、上皮細胞成長因子若しくは繊維芽細胞成長因子、ならびに亜セレン酸若しくはその塩を含有し、かつインドメタシン、プロスタグランジン、長鎖脂肪酸およびチアゾリジン誘導体よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物を含む初代前駆脂肪細胞の分化用培地。

【請求項5】 3%以下の血清を含む請求項4記載の初代前駆脂肪細胞の分化用培地。

【請求項6】 栄養培地がイーグル基本培地(MEM)、アルファイーグル基本培地(α MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、ハムのF-12培地から選ばれる少なくとも1種である請求項4または5に記載の初代前駆脂肪細胞の分化用培地。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、無血清あるいは低血清の条件下において、効率良く初代前駆脂肪細胞を脂肪細胞へと分化誘導させる方法及びその分化用培地に関する。更に詳しくは、肥満やその病態等に関する細胞生物学的、分子生物学的研究、あるいは肥満、糖尿病等の治療薬開発における評価系に有用な、無血清あるいは低血清の条件下において、効率良く初代前駆脂肪細胞を脂肪細胞に分化誘導させる方法及びその分化用培地に関する。

【0002】

【従来の技術】近年の肥満研究の結果、脂肪細胞は脂肪の合成、分解だけでなく、様々な生理活性物質を分泌し、脂肪組織だけでなく全身性に強く影響を及ぼす細胞であることが明らかになってきた。その為、肥満に伴う糖尿病、高血圧といった生活習慣病の発症メカニズムを理解する上で、また、これら疾患の治療法を開発する上

で、脂肪細胞の研究は不可欠となっている。特に、前駆脂肪細胞培養系を用いた評価は脂肪組織形成の動的メカニズムを研究する上で重要である。

【0003】前駆脂肪細胞とは発生上、脂肪細胞へ分化する能力を有している細胞である。すなわち、脂肪組織発生の初期段階では間葉系細胞から増殖性を有する繊維芽細胞様の前駆脂肪細胞が形成される。前駆脂肪細胞は増殖を停止した後、脂質合成酵素の発現が上昇し、細胞内に油滴が蓄積され、成熟した脂肪細胞へと分化する。

【0004】この現象は、培養細胞系でも認められ、脂肪組織から調製した前駆脂肪細胞をある誘導条件下で培養すると、油滴の蓄積、成熟脂肪細胞への分化が認められる。前駆脂肪細胞を用いた薬剤の評価は、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化過程での変化、あるいは分化した脂肪細胞に対する影響を調べることにより行う。いずれの場合も、前駆脂肪細胞から脂肪細胞へ分化誘導することが必要であり、その為にも、高い分化誘導能を有した分化用培地は必須である。前駆脂肪細胞を分化誘導させる培地としては、いくつか報告されているが、例えば、血清、インスリン、デキサメタゾン及び分化促進剤(例えば、インドメタシン、長鎖脂肪酸等)を含む培地等が報告されている。

【0005】これまで、前駆脂肪細胞の分化機構は、主に3T3-L1細胞や3T3-F442A細胞等の株化細胞を用いて研究されてきた。これらの細胞は、無限増殖が可能ならぬに、前駆脂肪細胞様の性質を有する点で、非常に有用である。しかしながら、株化細胞は生体本来の機能を欠失している場合が多く、実際に3T3-L1細胞や3T3-F442A細胞等の挙動は正常細胞での結果と一致していないことが報告されている。例えば、株化細胞の分化は非可逆的であるのに対し、正常細胞のそれは可逆的である。よって、より生体に近い結果を得る為には、脂肪組織から調製した初代前駆脂肪細胞を使用することが必要である。

【0006】一方、細胞の維持、培養には、栄養培地中に別途、増殖因子として血清成分をすることが一般的に行われている。しかし、血清は特定不能なあらゆる成分から構成されているため、薬剤評価等の実験に用いた場合、原因と結果を論じる際に混乱が生じるという問題がある。また、細胞培養に血清を用いる場合、通常10%量の添加が必要であり、高価な血清を大量に消費しなければならないという点も問題である。さらに、血清はロット間の性能差が大きく、その選定に多大な労力が必要とされる。よって、培養細胞を用いて薬剤評価等を行う場合は、血清成分を抑えた無血清あるいは低血清培地を使用することが望ましい。

【0007】しかしながら、これまで初代前駆脂肪細胞の分化には、培地中に血清成分を添加する必要があった。また、Kurii-Harcuchらの処方(Mol. Cell Biochem. 第79巻、第35頁、1987年)、So

rianoらの処方(Int.J Obesity 第17巻、第159頁、1993年)あるいはBjornstorpらの処方(Exp.Cell Res. 第189巻、第247頁、1990年)によると、無血清あるいは低血清の条件で前駆脂肪細胞の分化誘導を行っているが、これらはすべて株化細胞を用いた結果であり、これらを初代前駆脂肪細胞に適用しても効率の良い分化は認められない。また、奥田らは初代前駆脂肪細胞の分化用培地を報告しているが(機能細胞の分離と培養、1987年)、これには30%量の血清成分の添加が必要である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、かかる従来の問題点を解消すべく、無血清あるいは低血清の条件下で、効率良く初代前駆脂肪細胞を脂肪細胞に分化誘導させる方法及びその分化用培地を提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、ある特定の添加剤を加えることにより、無血清あるいは低血清培地中で、良好に初代前駆脂肪細胞を脂肪細胞へ分化誘導する方法を見出し、本発明を完成させるに至った。

【0010】(1)インスリン、トランスフェリン、デキサメタゾン、ピオチン、アスコルビン酸、グルコース、上皮成長因子若しくは繊維芽細胞成長因子、ならびに亜セレン酸若しくはその塩を含有し、かつインドメタシン、プロスタグランジン、長鎖脂肪酸およびチアゾリジン誘導体よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物を含む栄養培地中において初代前駆脂肪細胞を脂肪細胞へ分化誘導する方法。

(2)3%以下の血清を含む(1)の栄養培地を用いた初代前駆脂肪細胞を脂肪細胞へ分化誘導する方法。

(3)(1)または(2)の栄養培地がイーグル基本培地(MEM)、アルファイーグル基本培地(α MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、ハムのF-12培地から選ばれた少なくとも1種である初代前駆脂肪細胞を脂肪細胞へ分化誘導する方法。

(4)栄養培地がインスリン、トランスフェリン、デキサメタゾン、ピオチン、アスコルビン酸、グルコース、上皮細胞成長因子若しくは繊維芽細胞成長因子、ならびに亜セレン酸若しくはその塩を含有し、かつインドメタシン、プロスタグランジン、長鎖脂肪酸およびチアゾリジン誘導体よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物を含む初代前駆脂肪細胞の分化用培地。

(5)3%以下の血清を含む(4)の初代前駆脂肪細胞の分化用培地。

(6)栄養培地がイーグル基本培地(MEM)、アルファイーグル基本培地(α MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、ハムのF-12培地から選ばれた少なくとも1種である(4)または(5)の初代前駆

脂肪細胞の分化用培地。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明における初代前駆脂肪細胞は、正常動物の脂肪組織に由来する細胞であり、発生上、脂肪細胞に分化する能力を有する細胞である。初代脂肪細胞はヒト、ラットなどの各種動物から摘出した脂肪組織から物理的あるいは酵素処理により分離培養を行うことにより得ることができるが、好ましくはコラゲナーゼ消化法により調製する。例えば、ラットより摘出した脂肪組織を細切し、0.01~10mg/ml、より好ましくは0.1~5mg/mlのコラゲナーゼ溶液中で振とう消化させ、ナイロンメッシュでろ過後、遠心操作により、好適に前駆脂肪細胞を得ることができる。

【0012】本発明における栄養培地とは、動物細胞が増殖するに際して必須成分である、無機塩類、アミノ酸、ビタミン類などを含むものであり、その組成により種々の栄養培地がある。該栄養培地としては、例えば、MEM、 α MEM、DMEM、ハムのF-12培地などが挙げられるが、なかでもDMEM、 α MEMが特に好適に使用される。

【0013】本発明における栄養培地は、インスリン、トランスフェリン、デキサメタゾン、ピオチン、アスコルビン酸、グルコース、上皮成長因子若しくは繊維芽細胞成長因子、ならびに亜セレン酸若しくはその塩を含有し、かつインドメタシン、プロスタグランジン、長鎖脂肪酸及びチアゾリジン誘導体よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物を含む。さらには、好ましくは3%以下、より好ましくは0.3~1.0%の血清を含む。

【0014】ここで、インスリンとはペプチドの一種であり、動物、例えばブタ、ウシ、ヒトの血中から生産されたインスリン、または遺伝子組換え技術により生産されたインスリンのいずれも使用できる。該インスリンは、好ましくは1~100 μ g/ml、より好ましくは10 μ g/mlの濃度で添加する。

【0015】トランスフェリンとは血中の輸送鉄と結合するタンパク質であり、ウシあるいはヒト等の動物に由来するセロトランスフェリン、オホトランスフェリンがある。該トランスフェリンは、好ましくは1~100 μ g/ml、より好ましくは10 μ g/mlの濃度で添加する。

【0016】デキサメタゾンはグルココルチコイドの一種であり、好ましくは10~500 μ M、より好ましくは100 μ Mの濃度で添加する。

【0017】ピオチンはビタミンB群の一種であり、好ましくは0.01~3 μ g/ml、より好ましくは0.1 μ g/mlの濃度で添加する。

【0018】アスコルビン酸は分子量176.13の化合物であり、本発明においてはL体が好適に使用できる。該アスコルビン酸は、好ましくは10~500 μ g

／ml、より好ましくは50 μ g／mlの濃度で添加する。

【0019】グルコースは脂肪酸合成の炭素源として供給されるものであり、本発明ではD体が好適に使用できる。該グルコースは、好ましくは1～100mM、より好ましくは15mMの濃度で添加する。

【0020】上皮成長因子は上皮系細胞や種々の細胞に増殖刺激性を有するペプチドであり、動物組織、例えばマウス顎下腺やウシ脳下垂体から精製したものや遺伝子組換技術により生産したものがある。該上皮成長因子は、好ましくは0.1～10ng／ml、より好ましくは3ng／mlの濃度で添加する。

【0021】繊維芽細胞成長因子とは分子量14～18kDのタンパク質であり、ヘパリン吸着性を有し、繊維芽細胞をはじめ種々の細胞に対する増殖刺激性がある。繊維芽細胞成長因子は酸性と塩基性の2種以外にそのアミノ酸配列の相同性から数種類に分かれ、それぞれの動物組織、例えばマウス顎下腺やウシ脳下垂体から精製したものや遺伝子組換技術により生産したものを使用できる。該繊維芽細胞成長因子は、好ましくは0.1～10ng／ml、より好ましくは3ng／mlの濃度で添加する。

【0022】本発明に用いられる亜セレン酸塩としては、亜セレン酸ナトリウム、亜セレン酸カリウム等が挙げられる。該亜セレン酸若しくはその塩は、好ましくは1～100nM、より好ましくは10nMの濃度で添加する。

【0023】インスリン、トランスフェリン、ビオチン、アスコルビン酸、グルコース、上皮成長因子、繊維芽細胞成長因子、亜セレン酸若しくはその塩は、いずれも水溶性であり、そのまま添加しても良いが、各成分を混合した高濃度溶液を調製しておき、その一定量を加えるのも好ましい方法である。また、非水溶性のデキサメタゾンの場合、エタノールにあらかじめ溶解したものをを用いると良い。

【0024】また、インドメタシンは1-(p-コロロベンゾイル)-5-メトキシ-2-メチルインドール-3-酢酸とも呼ばれる、分子量357.79の化合物である。インドメタシンの場合、好ましくは10～500 μ M、より好ましくは100 μ Mの濃度で添加する。

【0025】プロスタグランジンは、アラキドン酸のようなエイコサポリエン酸から動物組織で合成される一群の生理活性物質の総称である。具体的には、プロスタグランジンD₂、プロスタグランジンF_{2α}、プロスタグランジンI₂、プロスタグランジンJ₂等が好適に使用できる。プロスタグランジンの場合、種類により異なるが、好ましくは1～100 μ M、より好ましくは10 μ Mの濃度で添加する。

【0026】長鎖脂肪酸は高級脂肪酸ともいい、炭素数11以上の脂肪酸の総称である。具体的には、オレイン

酸、リノール酸、パルミチン酸、アラキドン酸等が好適に使用できる。長鎖脂肪酸の場合、種類により異なるが、好ましくは0.5～500 μ M、より好ましくは1～100 μ Mの濃度で添加する。

【0027】チアゾリジン誘導体とはチアゾリジンから合成される一群の化合物であり、例えば、[(ω -(ヘテロシクリルアミノ)アルコキシル)ベンジル]-2,4-チアゾリジンジオン、(±)-5-[(2-(2-ナフタレニルメチル)-5-ベンゾキサゾイル)メチル]-2,4-チアゾリジンジオン等が例示される。具体的に、インスリン抵抗性改善薬として利用されるトログリタゾン(三共製薬製)、ピオグリタゾン(武田製薬製)、T-147(田辺製薬製)、BRL49653(スミスクライン・ビーチャム製)等が挙げられる。チアゾリジン誘導体の場合、種類により異なるが、好ましくは1～100 μ M、より好ましくは10 μ Mの濃度で添加する。

【0028】インドメタシン、プロスタグランジン、長鎖脂肪酸及びチアゾリジン誘導体は、いずれも試験管内において前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化を促進させる作用を有する化合物である。したがって、今後上記のもの以外に前駆脂肪細胞の分化を促進する化合物が同定されれば、この化合物も本発明に使用しうることが予測される。

【0029】インドメタシン、プロスタグランジン、チアゾリジン誘導体はいずれも非水溶性である。この場合、エタノールやジメチルスルホキシド等を溶媒として高濃度溶液を調製しておき、その一定量を加えるのも好ましい方法である。また、長鎖脂肪酸は細胞毒性作用を有するので、担体としてウシ血清アルブミンを加えるのも良い方法である。

【0030】本発明において使用する血清としては、例えば、ウシ胎児血清、仔ウシ血清、馬血清などが挙げられる。血清の含有量は、通常は0～3%であり、より好ましくは約1%程度である。

【0031】本発明において、初代前駆脂肪細胞に分化誘導を起こす方法は、例えば、初代前駆脂肪細胞をコンフレントになるまで培養した後、本発明の分化用培地に交換し、3～10日間培養する。培養はCO₂、インキュベーター内で5%CO₂、37℃の条件で行うことが望ましい。しかる後、細胞内に油滴の蓄積が光学顕微鏡により観察できるようになる。分化の程度の定量化は、細胞内に蓄積された中性脂肪量を定量することにより簡便に行うことができる。この場合、中性脂肪量が多いほど分化効率が高いことを示す。本発明における分化用培地では0～3%量の無血清あるいは低血清の条件において、従来よりも効率の良い分化が認められる。

【0032】

【実施例】以下、本発明を具体的に実施例にて説明する。本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

い。

【0033】1 初代前駆脂肪細胞の調製

Wister系ラット(10週齢、雄)より得た皮下脂肪組織を、PBSで洗浄後、ハサミで脂肪組織を約2mm×2mm×2mmに細切し、1mg/mlコラゲナーゼ、10mg/mlウシ血清アルブミンを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)に浸漬し、軽く振とうしながら37℃で消化させた。約30分間反応の後、脂肪組織が消化されたのを確認し、消化液を100μmナイロンメッシュで濾過した。この懸濁液を1000rpm、5分間遠心して初代前駆脂肪細胞を沈殿分画として回収した。このとき、成熟脂肪細胞は上層に浮遊層を形成した。得られた初代前駆脂肪細胞を10%ウシ胎児血清を含むDMEMに懸濁し、組織培養用シャーレに植え込み、5%CO₂、37℃のインキュベーター内で約80%コンフルントになるまで培養し、初代前駆脂肪細胞を得た。

【0034】2 初代前駆脂肪細胞の分化誘導

得られた初代前駆脂肪細胞を組織培養用24穴プレートに播種し、コンフルントになるまで10%ウシ胎児血清を含むDMEMにおいて培養した。コンフルントになった後、分化を誘導するために以下のような培地に交換して、7日間培養した。

【0035】実施例1

10μg/mlインスリン、10μg/mlトランスフェリン、100μMデキサメタゾン、0.1μg/mlピオチン、50μg/mlアスコルビン酸、15mMグルコース、30ng/ml上皮成長因子、10nM亜セレン酸、100μMインドメタシン、及び0.15~2.00%範囲の各ウシ胎児血清濃度を含むDMEM

【0036】比較例1

10μg/mlインスリン、10μg/mlトランスフェリン、100μMデキサメタゾン、15mMグルコース、100μMインドメタシン、及び0.15~2.00%範囲の各ウシ胎児血清濃度を含むDMEM

【0037】比較例2

0.15~2.00%範囲の各ウシ胎児血清濃度を含むDMEM

【0038】図1、図2及び図3に1%ウシ胎児血清濃度で分化誘導を行った場合の、各細胞形態を示す。図1の実施例1の細胞は図2及び図3の比較例1及び2に比

べて、油滴の蓄積が見られる分化した脂肪細胞像が高頻度で認められた。

【0039】分化の程度を定量化する為に、蓄積された中性脂肪量を中性脂肪測定試薬(東洋紡績製)にて測定した。コントロール及び実施例の細胞の24穴プレート1穴あたりに蓄積された中性脂肪量を図4に示す。0.15~2.00%の低血清条件下では、比較例1及び2に比べ、実施例1では有意に高い中性脂肪の蓄積が認められ、高い分化誘導能を保持していることが確認された。

【0040】

【発明の効果】上述したように、本発明は、インスリン、トランスフェリン、デキサメタゾン、ピオチン、アスコルビン酸、グルコース、上皮成長因子若しくは繊維芽細胞成長因子、ならびに亜セレン酸若しくはその塩を含有し、かつインドメタシン、プロスタグランジン、長鎖脂肪酸およびチアゾリジン誘導体よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物を加えた栄養培地を使用することにより、無血清あるいは低血清状態で初代前駆脂肪細胞を分化誘導することができる。したがって、初代前駆脂肪細胞を用いて、肥満やその病態等に関する細胞生物学的、分子生物学的機構を詳細に解析する際、または肥満、糖尿病等の治療薬を評価する際、血清成分の影響を考慮することなく、結果の分析を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の条件において、1%ウシ胎児血清濃度で分化誘導を行った場合の細胞形態を示した顕微鏡写真である。実施例の細胞では細胞中に油滴の蓄積が見られる分化した脂肪細胞が高頻度で認められた。

【図2】比較例1の条件において、1%ウシ胎児血清濃度で分化誘導を行った場合の細胞形態を示した顕微鏡写真である。比較例1では分化した脂肪細胞が少ない。

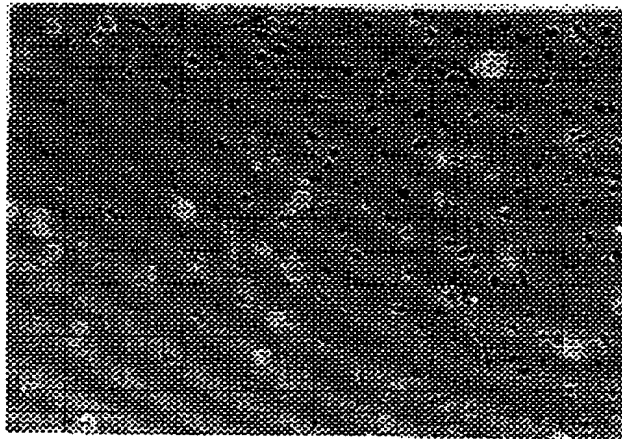
【図3】比較例2の条件において、1%ウシ胎児血清濃度で分化誘導を行った場合の細胞形態を示した顕微鏡写真である。比較例2では分化した脂肪細胞はほとんど認められない。

【図4】実施例1、比較例1及び比較例2について、0.15~2.00%の低血清条件下で分化誘導することにより蓄積された中性脂肪量を定量した結果を示したグラフである。

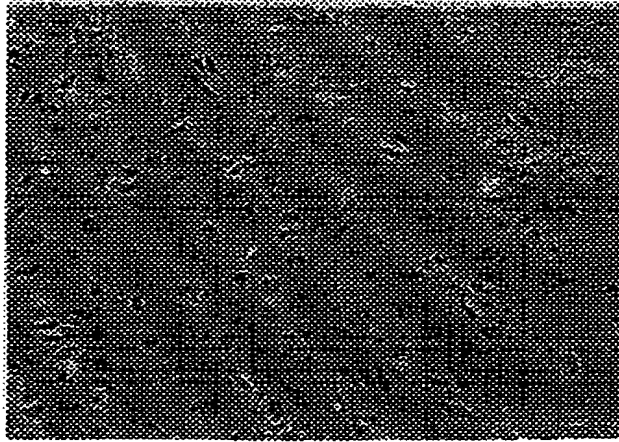
【図1】



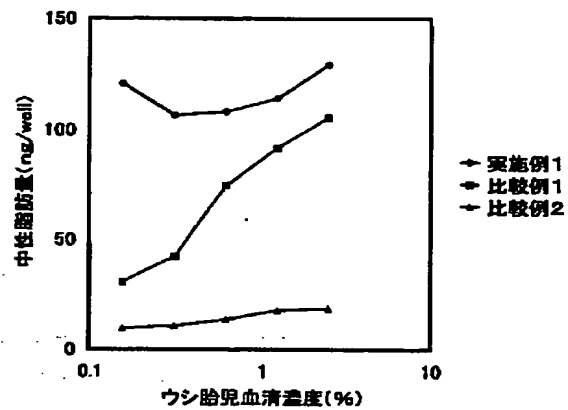
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 川村 良久
 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
 式会社敦賀バイオ研究所内

F ターム(参考) 4B065 AA90X BB02 BB10 BB13
 BB15 BB19 BB20 BB25 BB34
 BC50

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.